

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-328979

(43)Date of publication of application : 14.12.1993

(51)Int.Cl. C12P 7/02  
A23K 1/16  
C12N 1/20  
//(C12P 7/02  
C12R 1:01 )  
(C12N 1/20  
C12R 1:01 )

(21)Application number : 04-140602

(71)Applicant : KAIYO BIO TECHNOL  
KENKYUSHO:KK

(22)Date of filing : 01.06.1992

(72)Inventor : OTAKI NOBUKO  
YOKOYAMA AKIHIRO  
MIKI WATARU

## (54) PRODUCTION OF ZEAXANTHIN AND NOVEL FLEXIBACTER MICROORGANISM USED THEREFOR

### (57)Abstract:

**PURPOSE:** To industrially advantageously obtain the subject compound useful for redyeing culturing fishes, improving the yokes of eggs, antioxidants, etc., by culturing a Flexibacter sp.DK30223 strain in a medium and subsequently collecting the product from the culture solution.

**CONSTITUTION:** A Flexibacter sp.DK30223 strain as a spawn is inoculated on a medium containing peptone, a yeast extract, ferric phosphate, sodium acetate, purified water, sea water, etc., and then vibration-cultured at 25° C for 48hr. The obtained culture solution is transferred to a medium having the same composition as the medium used in the culture tank, cultured at 25° C for 72hr by an aeration-stirring method and then centrifuged into the cells and the medium. The cells are mixed with acetone and extracted with stirring. The extraction solution is collected, concentrated and subsequently subjected to an ethyl acetate/ water-distributing treatment. The ethyl acetate layer is separated, subjected to the evaporation of the solvent, again dissolved in benzene, and subsequently purified by silica gel chromatography and by high performance liquid chromatography to readily provide the objective zeaxanthin in high yield with an extremely general culture device.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision  
of rejection]

[Kind of final disposal of application other  
than the examiner's decision of rejection  
or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against  
examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japanese Patent Office

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-328979

(43)公開日 平成5年(1993)12月14日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 7/02		8114-4B		
A 2 3 K 1/16	3 0 3 A	9123-2B		
C 1 2 N 1/20	A	7236-4B		
// (C 1 2 P 7/02				
C 1 2 R 1:01)				

審査請求 未請求 請求項の数 2(全 3 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平4-140602

(22)出願日 平成4年(1992)6月1日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成4年4月2日～  
4月5日 社団法人日本水産学会主催の「平成4年度日  
本水産学会春季大会」において文書をもって発表

(71)出願人 591001949

株式会社海洋バイオテクノロジー研究所  
東京都文京区本郷二丁目35番10号

(72)発明者 大滝 伸子

静岡県清水市袖師町1900番地 株式会社海  
洋バイオテクノロジー研究所清水研究所内

(72)発明者 横山 昭裕

静岡県清水市袖師町1900番地 株式会社海  
洋バイオテクノロジー研究所清水研究所内

(72)発明者 幹 渉

静岡県清水市袖師町1900番地 株式会社海  
洋バイオテクノロジー研究所清水研究所内

(74)代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)

(54)【発明の名称】 ゼアキサンチンの製造方法及びこれに用いる新規フレキシバクター属微生物

(57)【要約】

【構成】 フレキシバクター sp. DK30223株を培地に培  
養し、培養物からゼアキサンチンを採取することを特徴  
とするゼアキサンチンの製造方法、及びゼアキサンチン  
を生産する能力を有するフレキシバクター sp. DK30223  
株。

【効果】 従来微細藻類の培養物より得られたゼアキサ  
ンチンを、極一般的な培養装置により、高収率で容易に  
得ることができる。また、微細藻類特有のクロロフィル  
の混入がなく、精製工程において大幅に改善された。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 フレキシバクター sp. DK30223株を培地に培養し、培養物からゼアキサンチンを採取することを特徴とするゼアキサンチンの製造方法。

【請求項2】 ゼアキサンチンを生産する能力を有するフレキシバクター sp. DK30223株。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、養殖魚の色揚げ、鶏卵の卵黄質改善等に有用であり、また抗酸化剤としても利用されるゼアキサンチンの微生物を利用した製造方法及びこれに用いる新規フレキシバクター属微生物に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】従来より、ゼアキサンチンは、養殖アユの色揚げや鶏卵の卵黄質改善等の目的で広く用いられており、そのほとんどが微細藻類の一種であるスピルリナの大量培養によって調製されている。しかし、微細藻類の培養においては、光合成に欠くことのできない光を供給しなければならず、太陽光採取のための立地条件や人工光供給のための培養装置等の設備が必要になる。また、微細藻類は、一般に生育速度が遅く、十分な培養密度を得るために一週間から数週間を要し、生産性に問題がある。更に、微細藻類由来のゼアキサンチンの精製においてクロロフィルとの分離が困難で精製工程が複雑である。これらの点を克服するために、陸上細菌 *Erwinia uredovora* による発酵生産も研究されている (J. Bacteriol. 172, 6704, 1990) が、その収率は極めて悪く実用上問題が残る。以上のことよりゼアキサンチンの簡易な製造方法の開発が望まれていた。

【0003】かかる課題を達成すべく、本発明者らは、先に、アルテロモナス属微生物を用いることにより、簡便にゼアキサンチンを製造することに成功し平成3年8月23日付けにて特願平3-212454号として特許出願をしたが、更に研究を重ねた結果、ダイダイイソカイメンに共存する微生物を用いることにより、より簡便かつ効率的にゼアキサンチンを製造することに成功し、本発明を完成するに至った。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、従来の微細藻類やバクテリアによる製造方法よりも簡便かつ効率的にゼアキサンチンを提供することを目的とする。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】本発明のゼアキサンチンの製造方法は、フレキシバクター sp. DK30223株を培地に培養し、培養物からゼアキサンチンを採取することを特徴とするものである。以下、本発明を詳細に説明する。

【0006】ゼアキサンチン生産菌株としては、海洋性フレキシバクター (Flexibacter) sp. DK30223 に属しゼ

アキサンチン生産能を有する菌株であれば、いずれの菌株でも用いることができる。また、これらの菌株の人工的変異方法、例えば紫外線照射、X線照射、変異誘起剤処理などあるいは自然発生による変異株、また遺伝子工学あるいは細胞融合による変異株でもゼアキサンチンを生産するものであれば、本発明に用いることができる。なお、フレキシバクター sp. DK30223株は、特願平3-212454号で用いられたアルテロモナス sp. KK10203C 株に比し、より高純度でゼアキサンチンを生産することから、目的物質を得る精製過程を省略することができる。

【0007】フレキシバクター sp. DK30223株の菌学的性質について以下に述べるが、該性質の決定は清水らの方法 (門田元、多賀信夫編：海洋微生物研究法、学会出版センターpp. 229 (1985)) に従った。形態学的検討は、光学顕微鏡を用い、特に孢子表面の形態については走査型電子顕微鏡によった。フレキシバクター sp. DK30223株の菌学的性質は以下の通りである。

## 【0008】(1) グラム染色

陰性

## (2) 形態

菌の形・大きさ : 桿状、 $10.0\mu\text{m} \times 0.2\mu\text{m}$

運動性 : あり

鞭毛 : なし

## (3) 菌体色素 : 黄色

## (4) 生理的性質

オキシダーゼ : 陽性

グルコース分解性 : 陰性

ゼラチン分解性 : 陰性

DNA分解性 : 陰性

## (5) OFテスト

陰性

以上の菌学的性質の知見から DK30223株をフレキシバクター (Flexibacter) 属に属する微生物と同定した。本属における種の同定においてはエヌ・アール・クリーグ (N. R. Krieg)、ジェイ・ジイ・ホルト (J. G. Holt) 編、バーjeeズ・マニュアル・オブ・システムチック・バクテリオロジー (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology) をもとに検索した。

【0009】検索の結果、DK30223株の性質と一致する種を特定することは困難であり、DK30223株をフレキシバクター sp. DK30223株として工業技術院微生物工業技術研究所に微工研菌寄第 12889号 (FERM P-12889) として寄託した (原寄託日：平成4年3月19日)。上記微生物は一般に微生物の培養に用いられる培地で培養され、生産されるゼアキサンチンは常法により採取することができる。

【0010】培地としては、資化可能な炭素源、窒素源、無機物及び必要な生育、生産促進物質を程よく含有する培地であれば合成培地、天然培地いずれでも使用可能である。炭素源としては、グルコース、澱粉、デキス

トリン、マンノース、フルクトース、シュクロース、ラクトース、キシロース、アラビノース、マンニトール、糖蜜などを単独又は組み合わせて用いられる。更に、菌の資化能によっては炭化水素、アルコール類、有機酸なども用いられる。窒素源としては、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、硝酸ナトリウム、尿素、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、乾燥酵母、コーン・スチープ・リカー、大豆粉、カザミノ酸などが単独又は組み合わせて用いられる。そのほか、食塩、塩化カリウム、硫酸マグネシウム、炭酸カルシウム、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二カリウム、硫酸第一鉄、塩化カルシウム、硫酸マンガン、硫酸亜鉛、硫酸銅などの無機塩類や海水を必要に応じて加える。また、使用菌の生育やゼアキサンチンの生産を促進する微量成分を適当に添加することができる。

【0011】培養法としては一般の培養法が用いられるが、液体培養法、特に深部攪拌培養法が最も適している。培養温度は16～37℃、特に22～30℃が適当であり、培養中の培地のpHはアンモニア水や炭酸アンモニウム溶液などを添加して、4～10、特に6～8に維持することが望ましい。液体培養で通常1～7日培養を行うと、目的物質のゼアキサンチンが菌体中に生成蓄積される。培養物中の生成量が最大に達したときに培養を停止する。

【0012】培養物からのゼアキサンチンの単離精製は、微生物代謝生産物をその培養物から単離精製するために常用される方法に従って行われる。例えば、培養物を濾過により培養濾液と菌体に分け、菌体をヘキサン、ベンゼン、クロロホルム、アセトン、エーテル、酢酸エチルなどの有機溶媒で抽出する。次いで、この抽出液を濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、ゲルろ過(Sephadex LH-20)等によりゼアキサンチンを分離、精製する。なお、培養、精製操作中のゼアキサンチンの動向は薄層クロマトグラフィーによるゼアキサンチンの黄色を目安として追跡することができる。

【0013】

【実施例】以下、実施例により本発明を更に具体的に説明するが、本発明の範囲はこれに限定されるものではないことはいうまでもない。

(実施例1) 種菌としてフレキシバクター sp. DK30223株を用いる。ペプトン5g/L、酵母エキス1g/L、リン酸第二鉄0.04g/L、酢酸ナトリウム0.01g/L、精製水250ml、海水750mlの組成を有する種培地(殺菌前pH7.7)500mlを1L容量の三角フラスコに作製後、該菌株1コロニーを植菌し、25℃で48時間振とう(100rpm)前培養した。このようにして得られた種培養液を10L容量の培養槽中の上記組成と同一の組成の培地5Lに10% v/v の割合で移し、25℃で通気攪拌方式(回転数100rpm, 通気量1L/分)により培養を行った。

【0014】培養中、培地のpHは特に制御しないで、72時間培養した。培養液を遠心分離により菌体と培地に分け、培地を除去し、菌体にアセトン200mlを添加し攪拌した後、沈澱物を濾別し、抽出液200mlを得た。抽出液を濃縮し、酢酸エチル/水分配により酢酸エチル層を分取した。次いで、酢酸エチル層を硫酸ナトリウムにより脱水後、溶媒留去しベンゼンに再溶解した。これを更に高速液体クロマトグラフィー(ナカライテスク社製コスモシル5SL、内径8mm長さ250mm、ヘキサン:アセトン=8:2、流速1.2ml/分)で精製し、溶出された画分を濃縮し、黄色色素8mgを得た。このようにして得られた黄色色素は、高速液体クロマトグラフィーのリテンションタイム、紫外可視吸収スペクトル及び各種機器分析データが公知のものと一致したことから、ゼアキサンチンと同定した。

【0015】

【発明の効果】本発明によれば、従来微細藻類の培養物より得られたゼアキサンチンを、極一般的な培養装置により、高収率で容易に得ることができる。また、微細藻類特有のクロロフィルの混入がなく、精製工程において大幅に改善された。

フロントページの続き

(51)Int. Cl.<sup>5</sup>

(C12N 1/20

C12R 1:01)

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所